

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

08/765244



REC'D 03 JUL 1995

WIPO PCT

Bescheinigung

Herr Dr. rer.nat. Peter S e i b e l und Frau
Andrea S e i b e l , beide in 97320 Albertshofen,
haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment, Verfah-
ren zu seiner Herstellung und Verfahren zur
zielgerichteten Nukleinsäureeinbringung in
Zellorganellen und Zellen"

am 16. Juni 1994 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N 15/63, C 12 N 15/79, C 12 N 15/11, C 12 N 15/10
und A 61 K 48/00 der Internationalen Patentklassifikation er-
halten.

PRIORITY DOCUMENT

München, den 29. Juni 1995

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

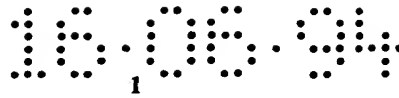
Mackus

Aktenzeichen: P 44 21 079.5

15.05.94

Zusammenfassung

Um Erbgut zielgerichtet in Zellorganellen einzuführen, wird die entsprechende Nukleinsäure an ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Peptid gebunden. Unter Ausnutzung der natürlichen Proteintransportwege wird die Nukleinsäure von dem Peptid zum Zielkompartiment dirigiert und durch die Membran (das Membransystem) transportiert. Das Verfahren ermöglicht durch beliebige Kombination von Nukleinsäuren und kompartimentspezifischen Proteinsequenzen die zielgerichtete Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen und Zellorganellen und damit die Verwendung dieses Systems sowohl in der zielgerichteten Mutagenese als auch zur molekularen Therapie genetischer Erkrankungen.



Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment, Verfahren zu seiner Herstellung und Verfahren zur zielgerichteten Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen

Diese Erfindung betrifft ein chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment, ein Verfahren zu seiner Herstellung und ein Verfahren zur zielgerichteten Einbringung von Nukleinsäuren
5 in Zellorganellen und Zellen.

Es ist bekannt, daß zelluläre Membransysteme weitestgehend impermeabel für Nukleinsäuren sind. Durch physikalische Prozesse (Transformation) und biologische Vorgänge (Infektion) können Zellmembranen aber sehr effizient überwunden werden. Der Transformation, also dem unmittelbaren Aufnehmen der nackten Nukleinsäure durch die
10 Zelle geht eine Behandlung der Zellen voraus. Unterschiedliche Methoden zur Erzeugung dieser 'kompetenten Zellen' stehen zur Verfügung. Die meisten Verfahren basieren auf den Beobachtungen von Mandel und Higa (M. Mandel *et al.* (1970), "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection", J. Mol. Biol. 53: 159-162), die erstmals zeigen konnten, daß die Ausbeuten bei der Aufnahme von Lambda-DNA durch Bakterien in Gegenwart
15 von Calciumchlorid ganz wesentlich gesteigert werden. Diese Methode ist erstmals auch von Cohen *et al.* (S.N. Cohen *et al.* (1972), "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 2110-2114) für Plasmid-DNA erfolgreich eingesetzt und durch viele Modifikationen verbessert worden (M. Dagert *et al.* (1979), "Prolonged incubation in
20 calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells", Gene 6: 23-28). Eine andere Transformationsmethode beruht auf der Beobachtung, daß hochfrequente Wechselstromfelder Zellmembranen aufbrechen können (Elektroporation). Diese Technik läßt sich ausnutzen, um nackte DNA nicht nur in prokaryotische Zellen, sondern auch in eukaryotische Zellsysteme einzuschleusen (K. Shigekawa *et al.* (1988), "Electroporation of
25 eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells", Biotechniques 6: 742-751). Zwei sehr sanfte Methoden zur DNA-Einbringung in eukaryotische Zellen wurden von Capecchi (M.R. Capecchi, (1980), "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells", Cell 22:

- 479-488) und Klein et al. (T.M. Klein *et al.* (1987), "High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells", *Nature* 327: 70-73) entwickelt: sie beruhen einmal auf der direkten Injektion der DNA in die einzelne Zelle (Mikroinjektion), sowie auf der Beschießung einer Zellpopulation mit Mikroprojekten aus Wolfram, an deren
- 5 Oberfläche die betreffenden Nukleinsäure gebunden wurde ('Shotgun'). Parallel zur physikalischen Transformation von Zellen haben sich die biologischen Infektionsmethoden bewährt. Dazu zählen insbesondere die hocheffiziente virale Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen (K.L. Berkner, (1988), "Development of adenovirus vectors for the expression of heterologous genes", *Biotechniques* 6: 616-629; L.K. Miller, (1989),
- 10 "Insect baculoviruses: powerful gene expression vectors", *Bioessays* 11: 91-95; B. Moss *et al.* (1990), "Product review. New mammalian expression vectors", *Nature* 348: 91-92) und die über Liposomen vermittelte Lipofektion (R.J. Mannino *et al.* (1988), "Liposome mediated gene transfer", *Biotechniques* 6: 682-690; P.L. Felgner *et al.* (1987), "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure", *Proc. Natl.*
- 15 *Acad. Sci. U. S. A.* 84: 7413-7417). Alle bisher beschriebenen Methoden behandeln das Überwinden der prokaryotischen oder eukaryotischen Plasmamembran durch nackte oder verpackte Nukleinsäuren. Während mit dem Einschleusen der Nukleinsäure in die prokaryotische Zelle der Wirkort bereits erreicht ist, finden in der kompartmentierten eukaryotischen Zelle weitere biochemische Prozesse statt, die unter bestimmten
- 20 Bedingungen das Eindringen der Nukleinsäure in den Zellkern unterstützen (z. B. viraler Infektionsweg bei HIV). Analoge Infektionsprozesse, bei denen exogene Nukleinsäuren aktiv in andere Zellorganellen eingeschleust werden (z. B. in Mitochondrien), wurden bisher nicht beschrieben. Vestweber und Schatz konnten 1989 zeigen, daß künstliche Nukleoproteine in isolierte Hefemitochondrien aufgenommen werden können (D.
- 25 Vestweber *et al.* (1989), "DNA-protein conjugates can enter mitochondria via the protein import pathway", *Nature* 338: 170-172). Ein Verfahren zur Einbringung von Nukleinsäuren, z. B. in Form exprimierbarer DNA oder transkribierter Gene (RNA) in Zellorganellen ist nicht bekannt. Ein derartiges Verfahren ist aber Voraussetzung, um Veränderungen des mitochondrialen Genoms bei Patienten mit neuromuskulären und

neurodegenerativen Erkrankungen auf genetischer Ebene behandeln, oder eine zielgerichtete Mutagenese in Zellorganellen durchführen zu können.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, ein chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment zu konstruieren, das das gerichtete Einschleusen von Nukleinsäuren in Zellen und Kompartimente eukaryotischer Zellen erlaubt. Außerdem soll ein Verfahren bereitgestellt werden, wie das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment in Zellkompartimente oder Zellen gelangen kann. Das Verfahren soll zur Therapie von genetischen Erkrankungen (Veränderungen am mitochondrialen Genom) und zur zielgerichteten Mutagenese in eukaryotischen und prokaryotischen Zellen eingesetzt werden. Dazu werden folgende Anforderungen an die Erfindung gestellt:

- universelle Anwendbarkeit
- zell-, kompartiment- und membranspezifisches Einschleusungsverhalten
- hohe Effektivität
- geringe Immunogenität
- 15 - Minimierung des Infektionsrisikos

Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale der Patentansprüche 25) und 29) oder 27) und 30). Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Grundlage für die Lösung dieser Problemstellung ist die Erkenntnis, daß große Biomoleküle (Proteine) natürlicherweise in Zellen bzw. in Zellkompartimente über einen hochspezifischen Transportmechanismus gelangen. Am Beispiel der Proteintranslokation in Mitochondrien soll dieser Mechanismus erläutert werden. Um ein Protein innerhalb einer Zelle vom Entstehungsort gezielt zu einem anderen Kompartiment oder einer anderen Zellorganelle (z. B. den Wirkort) befördern zu können, wird das Protein in der Regel als Präprotein synthetisiert (R. Zimmermann *et al.* (1983), "Biosynthesis and assembly of nuclear-coded mitochondrial membrane proteins in *Neurospora crassa*", Methods Enzymol. 97: 275-286). Neben der maturierten Aminosäuresequenz verfügt das

Präprotein über eine sogenannte Signalsequenz. Diese Signalsequenz ist spezifisch für das Zielkompartiment und sorgt dafür, daß das Präprotein durch Oberflächenrezeptoren erkannt werden kann. Das natürliche Hindernis 'Membran' wird dann überwunden, indem das Präprotein durch einen aktiven (mehrere 'Transport-Proteine' sind an diesem Prozeß
5 beteiligt) oder passiven Prozeß (direkter Durchtritt ohne Beteiligung weiterer Proteine) durch die Membran transloziert wird (G. Schatz, (1993), "The protein import machinery of mitochondria", Protein Sci. 2: 141-146; B.S. Glick *et al.* (1992), "Protein sorting in mitochondria", Trends. Biochem. Sci. 17: 453-459). Am Wirkort wird dann die Signalsequenz in der Regel durch eine spezifische Peptidase abgetrennt, sofern sie nicht
10 selbst Bestandteil des maturierten Proteins ist. Das maturierte Protein kann nun seine enzymatische Aktivität entfalten. Dieser natürliche Mechanismus soll nun ausgenutzt werden, um Nukleinsäuren zielgerichtet durch Membranen zu schleusen. Dazu wird eine zell-, kompartiment- oder membranspezifische Signalsequenz an die gewünschte Nukleinsäure gekoppelt. Mit der Imitierung dieses natürlichen Transportprozesses durch
15 das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment können nun Nukleinsäuren gezielt Zellmembranen überwinden und innerhalb einer Zelle in ein gewünschtes Zielkompartiment dirigiert werden.

Für die Konstruktion des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragmentes werden drei Komponenten benötigt:

- 20 - Signalpeptid (zell-, kompartiment- oder membranspezifisch)
- Kopplungsagenz
- Nukleinsäure (Oligonukleotid)

Die Auswahl der Signalsequenz hängt davon ab, welche Membran bzw. welches Membransystem überwunden und welches Zielkompartiment der Zelle (Zellkern,
25 Mitochondrion, Chloroplast) oder der Zellorganelle erreicht werden soll. Proteine, die zum Beispiel in eines der vier mitochondrialen Kompartimente (äußere Mitochondrienmembran, Intermembranraum, innere Mitochondrienmembran, Matrixraum)

eingeführt werden sollen, besitzen kompartimentspezifische Signalsequenzen. Für die Einbringung von Nukleinsäuren werden im allgemeinen Signalsequenzen ausgewählt, die ein zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Erkennungssignal enthalten und dadurch die angehängte Nukleinsäure an ihren Wirkungsort dirigieren (hier: innere Seite der inneren Mitochondrienmembran oder Matrixraum). Zur Auswahl stehen Signalsequenzen, die Proteine in Gegenwart oder Abwesenheit eines Membranpotentials transportieren können. Für die Nukleinsäureeinbringung werden Signalsequenzen bevorzugt, die unabhängig von Membranpotentialen arbeiten, z.B. die Signalsequenz der Ornithintranscarbamylase (OTC) für den Transport in den Matrixraum der Mitochondrien (A.L. Horwich *et al.* (1983), "Molecular cloning of the cDNA coding for rat ornithine transcarbamoylase", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 4258-4262; J.P. Kraus *et al.* (1985), "A cDNA clone for the precursor of rat mitochondrial ornithine transcarbamylase: comparison of rat and human leader sequences and conservation of catalytic sites", Nucleic. Acids. Res. 13: 943-952). Grundsätzlich ist für den Transport in das Zielkompartiment die reine Signalsequenz ausreichend. Bevorzugt werden aber Signalsequenzen ausgewählt, die zusätzlich über eine zell- oder kompartimentspezifische Peptidasespaltstelle verfügen. Diese 'Spaltstelle' liegt im günstigsten Fall innerhalb der Signalsequenz, kann aber auch an diese durch zusätzliche Aminosäuren angefügt werden, um nach dem Erreichen des Zielkompartimentes das Abspalten der Signalsequenz sicherzustellen (z.B. kann die Signalsequenz der menschlichen OTC um weitere zehn Aminosäuren der maturierten OTC verlängert werden). Damit wird gewährleistet, daß die Nukleinsäure im Zielkompartiment von dem Signalpeptid abgetrennt werden kann und sich damit die Wirkung der Nukleinsäure voll entfaltet. Hergestellt wird die ausgewählte Signalsequenz auf biologischem (Aufreinigung natürlicher Signalsequenzen oder Klonierung und Expression der Signalsequenz in einem eukaryotischen oder prokaryotischen Expressionssystem), bevorzugt aber auf chemisch-synthetischem Weg.

Um eine lineare chemische Verknüpfung zwischen Nukleinsäure und Signalpeptid zu gewährleisten, erfolgt die Kopplung des Signalpeptids über ein Kopplungsagenz, das im allgemeinen über Aminosäuren, bevorzugt über Aminosäuren mit reaktiven Seitengruppen,

bevorzugt über ein einzelnes Cystein oder Lysin am Carboxy-terminalen Ende des Signalpeptides mit diesem verbunden ist. Als Kopplungsreagenz dient ein bifunktionaler Crosslinker, bevorzugt ein heterobifunktionaler Crosslinker, der bei Verwendung eines Cysteins als Kopplungsstelle am Signalpeptid neben einer thiolreaktiven Gruppe über eine
 5 zweite reaktive Gruppe, bevorzugt eine aminoreaktive Gruppierung verfügt (z. B. m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester, MBS und seine Derivate).

Auch die Nukleinsäure verfügt über eine Kopplungsstelle, die kompatibel zum ausgewählten Crosslinker sein muß. Bei der Verwendung von MBS muß das Oligonukleotid über eine Amino- oder Thiolfunktion verfügen. Die Kopplungsgruppe der
 0 Nukleinsäure kann über die chemische Synthese des Oligonukleotids eingeführt werden und ist im allgemeinen am 5'-Ende, am 3'-Ende, bevorzugt aber direkt an einer modifizierten Base lokalisiert, z. B. als 5'-Aminolinker (TFA-Aminolinker Amidite^R, 1,6-(N-Trifluoroacetyl-amino)-hexyl-β-Cyanoethyl-N,N-Diisopropyl Phosphoramidite, Pharmacia) oder als 5'-Thiollinker (THIOL-C6 Phosphoramidit^R, MWG Biotech) an einer
 15 freien 5'-Hydroxy/Phosphatgruppe, als 3'-Aminolinker (3'-Aminomodifier-C7-CPG-Synthesäulen^R, MWG Biotech) an einer freien 3'-Hydroxy/Phosphatgruppe, bevorzugt aber als aminomodifiziertes Basenalogon, bevorzugt aminomodifiziertes Deoxyuridin (Amino-Modifier-dT^R, 5'-Dimethoxy-trityl-5-[N-(trifluoroacetylaminohexyl)-3-acrylimido]-2'-desoxy uridin, 3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite, Glen
 20 Research) innerhalb der Sequenz. Die zum verwendeten Crosslinker kompatible reaktive Gruppe ist dabei mindestens durch eine C2-Spacer Einheit, bevorzugt aber durch eine C6-Spacer Einheit vom 5'- oder 3'-Ende des Oligonukleotids oder der modifizierten Base distanziert. Die Nukleinsäure (Oligonukleotid) mit reaktiver Kopplungsgruppe umfaßt dabei mindestens zwei Nukleotide.

25 Um die Stabilität der Nukleinsäure (Oligonukleotid) gegenüber zellulären und extrazellulären Nukleasen zu erhöhen, können die chemisch synthetisierten Nukleinsäuren durch ein sulfurifizierendes Reagenz (Beaucage-Reagenz^R, MWG-Biotech) geschützt werden. Bei der chemischen Synthese werden dabei die Phosphordiester-Bindungen der

Nukleinsäure in Phosphorthioat-Bindungen umgewandelt. Dieses Oligonukleotid läßt sich dann für die enzymatische Amplifizierung von Nukleinsäuren einsetzen, durch weitere Verknüpfungsreaktionen mit anderen Nukleinsäuren verlängern oder direkt verwenden. Um das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment direkt einzusetzen, sollte die Nukleinsäure (Oligonukleotid) über eine hybridisierungsfähige Sekundärstruktur verfügen, bevorzugt ohne interne Homologien, um eine lineare Einzelstrangstruktur ausbilden zu können. Damit wird sichergestellt, daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragmentes ohne weitere Nukleinsäureankopplungen eine biochemische/therapeutische Wirkung entfalten kann.

0 Zur Kopplung mit der Signalsequenz werden aber bevorzugt Nukleinsäuren (Oligonukleotide) eingesetzt, die über zwei weitere Eigenschaften verfügen:

1. Die Sequenz ist palindromisch, bevorzugt partiell palindromisch, mit einem glatten 5'-3'-Ende ('blunt end'), überhängendem 3'- Ende ('sticky end'), bevorzugt aber mit überhängendem, phosphorylierten 5'-Ende ('sticky end'). Dadurch kann sich eine stabile, monomere Sekundärstruktur ('hairpin-loop') ausbilden. Das überhängende 5'-Ende dient dazu, definierte Nukleinsäuren, Antisense-Oligonukleotide, bevorzugt aber transkribierbare und replizierbare Gene anzukoppeln.

2. Das Oligonukleotid trägt im Scheitelpunkt des 'loops' eine modifizierte Base, die eine zum Crosslinker reaktive Gruppierung trägt, bevorzugt ein aminomodifiziertes 2'-Deoxythymidin. Die Aminofunktion dieser modifizierten Base ermöglicht dabei die Kopplungsreaktion zwischen MBS und Oligonukleotid.

Das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment eignet sich zum gezielten Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen und Zellorganellen (z. B. Zellkern, Chloroplast), insbesondere zum Einbringen von Ribonukleinsäuren (mRNAs, 'Antisense'-Oligonukleotide) und Desoxyribonukleinsäuren (vollständigen Gene, 'Antisense'-Oligonukleotide). Ganz

besonders eignet er sich zum Einschleusen von transkribierbaren und prozessierbaren Genen in Mitochondrien.

Dazu muß an die Nukleinsäure, enthaltend die reaktive Kopplungsstelle, oder an das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment ein transkribierbares Gen angekoppelt werden.

- 5 Bevorzugt geschieht dies durch die Amplifizierung eines Gens, bevorzugt eines klonierten Gens, das aus einem mitochondrialen Promotor, bevorzugt dem Promotor des leichten DNA Stranges (O_L , nt 490 - nt 369) und dem zu expremierenden Gen in einer prozessierbaren Form, bevorzugt einem mitochondrialen Gen, bevorzugt einer mitochondrialen transfer RNA, bevorzugt der mitochondrialen $tRNA^{Leu(UR)}$ (nt 3204 - nt 0 3345), besteht (S. Anderson *et al.* (1981), "Sequence and organization of the human mitochondrial genome", Nature 290: 457-465). Nach der enzymatischen Amplifizierung des Gens kann die Kopplung an die Nukleinsäure, enthaltend die reaktive Kopplungsstelle, oder an das chimäre Peptid-Nukleinsäure-Fragment über eine 'blunt-end'-Ligation, bevorzugt aber eine 'sticky-end'-Ligation, angekoppelt werden. Um die Stabilität der 15 Nukleinsäure gegenüber zellulären und extrazellulären Nukleasen zu erhöhen, können die Phosphordiester-Bindungen der Nukleinsäure durch Phosphorthioat-Bindungen substituiert und damit geschützt werden, wenn bereits bei der enzymatischen Amplifizierung modifizierte Phosphorthioat-Nukleotide verwandt werden.

- Gegenüber den in der Einleitung erwähnten Transformations- und Infektionsmethoden 20 bietet dieses Verfahren erstmals die Möglichkeit, Nukleinsäuren zielgerichtet in Zellen und Zellorganellen einzuführen. Welches Zielkompartiment dabei erreicht werden soll (Cytosol, Nukleus, Mitochondrium, Chloroplast, etc.) kann durch die Wahl der Signalsequenz bestimmt werden. Neben dem kompartiment- und zellspezifischen Einschleusungsverhalten zeichnet sich dieses Verfahren durch seine universelle 25 Anwendbarkeit aus. Sowohl prokaryotische als auch eukaryotische Zellen und Zellsysteme können mit dem Translokationsvektor behandelt werden. Da bei der zielgerichteten Einschleusung ein natürliches Transportsystem der Membranen benutzt wird, erübrigt sich die Behandlung der Zellen oder Zellorganellen mit membranpermeabilisierenden Agenzien

(z.B. Calciumchlorid-Methode, s.o.). Anwendungsgebiete sind dabei z. B. die zielgerichtete Mutagenese und die Therapie genetischer Erkrankungen. In diesem Zusammenhang besticht das System durch eine höchstmögliche Effektivität der Translokation (Imitierung eines evolutionär optimierten Proteintransportwegs; abhängig von der ausgewählten Signalsequenz können mehr als 1000 Moleküle in ein einzelnes Mitochondrium aufgenommen werden), sowie durch die Minimierung der Immunogenität (kurze Signalpeptide, keine vollständigen und damit stark antigenen Proteine). Durch eine Integration des Translokationsvektors in Liposomen kann die Immunogenität dabei noch weiter erniedrigt werden. Insbesondere für eine genetische Therapie ist ein derartiger Ansatz vorteilhaft. In diesem Zusammenhang zeichnet sich das Translokationsvektor-Verfahren gegenüber den viralen Infektionssystemen außerdem durch ein äußerst geringes Infektionsrisiko aus. Dadurch kann es ohne Sicherheitsrisiko angewandt werden.

Beispiel:

Um den Nachweis erbringen zu können, daß Nukleinsäuren durch das oben beschriebene Verfahren zielgerichtet durch Membranen transportiert werden können, wurde die Überwindung des mitochondrialen Doppelmembransystems mit einem DNA-Translokationsvektor studiert. Dazu wurde die mitochondriale Signalsequenz der Ornithintranscarbamylase (A.L. Horwich *et al.* (1983), "Molecular cloning of the cDNA coding for rat ornithine transcarbamoylase", Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80: 4258-4262) (Enzym des Harnstoffzyklus, natürlicherweise in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert) chemisch hergestellt und gereinigt. Als reaktive Gruppe zur späteren Verbindung mit der DNA wurde die Originalsequenz um ein Cystein am C-Terminus erweitert (siehe Figur 1). Damit wurde gewährleistet, daß die Kopplung des heterobifunktionellen Crosslinkers (MBS) nur an die Thiol-Gruppe des einzigen Cysteins erfolgen kann. Als Verknüpfungspartner wurde ein DNA-Oligonukleotid (39 Nukleotide) ausgewählt, das sich durch zwei besondere Merkmale auszeichnet:

1. Die Sequenz ist partiell palindromisch mit einem überhängenden, phosphorylierten 5'-Ende (siehe Figur 1). Dadurch kann sich ein sogenannter 'hairpin-loop' ausbilden. Das überhängende 5'-Ende dient dazu, definierte Nukleinsäuren an dieses Oligonukleotid zu ligieren, die dann in die Mitochondrien importiert werden können.
2. Das Oligonukleotid trägt im Scheitelpunkt des 'Loops' eine modifizierte Base (siehe Figur 1). Es handelt sich dabei um ein aminomodifiziertes 2'-Deoxythymidin (siehe Figur 2). Die Aminofunktion der modifizierten Base ermöglicht dabei die Kopplungsreaktion zwischen MBS und Oligonukleotid.

Die Verknüpfung der drei Reaktionspartner (Oligonukleotid, MBS und Peptid) erfolgt in einzelnen Reaktionsschritten. Zuerst wird das Oligonukleotid (50 pmol) in einem Puffer (100 µl; 50 mM Kaliumphosphat, pH 7.6) zusammen mit MBS (10 nmol gelöst in DMSO) umgesetzt (Reaktionszeit: 60 min.; Reaktionstemperatur: 20°C). Nicht umgesetztes MBS wird über eine 'Nick-Spin-Column^R' (Sephadex G 50, Pharmacia), die mit 50 mM Kaliumphosphat (pH 6.0) equilibriert wurde, abgetrennt. Das Eluat enthält das gewünschte Reaktionsprodukt und wird in einem weiteren Reaktionsschritt mit dem Peptid (2.5 nmol) umgesetzt (Reaktionszeit: 60 min.; Reaktionstemperatur: 20°C). Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von Dithiothreitol (2 mM). Das Kopplungsprodukt (Chimäre, siehe Figur 3) wurde über eine präparative Gelelektrophorese von nicht umgesetzten Edukten abgetrennt und durch eine Elektroelution aus dem Gel isoliert (siehe Figur 4). An das überhängende 5'-Ende des Oligonukleotids lassen sich nun durch einfache Ligation unterschiedliche Nukleinsäuren ankoppeln.

Für das im Folgenden beschriebene Experiment wurde eine 283 bp lange doppelsträngige DNA (dsDNA) über eine enzymatische Reaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrizen DNA diente dazu ein in pBluescript^R (Stratagene) kloniertes DNA-Fragment, das neben dem menschlichen mitochondrialen Promotor des leichten Stranges (P_L, nt 902 - nt 369) das Gen für die mitochondriale transfer RNA Leucin (tRNA^{Leu(UR)}, nt 3204 - nt 4126) enthielt (siehe Figur 5). Als Amplifizierungsprimer dienten zwei Oligonukleotide, wobei Primer 1

über ein nichtkomplementäres 5'-Ende verfügte (siehe Figur 5). Die Modifikation der dsDNA erfolgte durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4-DNA-Polymerase (Inkubation in Gegenwart von 1 mM dGTP), die unter dem Fachmann bekannten Bedingungen überhängende 5'-Enden erzeugen kann (C. Aslanidis *et al.* (1990),
5 "Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR)", *Nucleic. Acids. Res.* 18: 6069-6074).

Zusammen mit dem bereits konjugierten Peptid-MBS-Oligonukleotid konnte die PCR-amplifizierte DNA unter Verwendung der T4-DNA-Ligase zusammengefügt werden. Um die Verknüpfungspartner nach der Einbringung in die Mitochondrien einfach
0 detektieren zu können, wurde die freie 5'-OH Gruppe der ligierten DNA durch eine enzymatische Reaktion radioaktiv phosphoryliert (A. Novogrodsky *et al.* (1966), "The enzymatic phosphorylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. I. Phosphorylation at 5'-hydroxyl termini", *J. Biol. Chem.* 241: 2923-2932; A. Novogrodsky *et al.* (1966), "The enzymatic phosphorylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic
15 acid. II. Further properties of the 5'-hydroxyl polynucleotide kinase", *J. Biol. Chem.* 241: 2933-2943).

Für die Isolierung von Mitochondrien wurde eine frische Rattenleber zerkleinert, in 25 mM HEPES, 250 mM Saccharose, 2mM EDTA, 52 µM BSA suspendiert und in einem Glashomogenisator (50 ml) homogenisiert. Zellmembranen, Zelltrümmer und Zellkerne
20 wurden bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand für eine weitere Zentrifugation vorbereitet. Dazu wurde der Überstand in gekühlte Zentrifugenbecher überführt und bei 8000 g zentrifugiert. Die isolierten Mitochondrien wurden in 200 ml desselben Puffers resuspendiert und erneut bei 8000 g zentrifugiert. Das saubere Mitochondrienpellet wurde in einem gleichen Volumen desselben Puffers resuspendiert und durch Zugabe von 25 mM
25 Succinat, 25 mM Pyruvat und 15 mM Malat energetisiert. Der Proteingehalt der Suspension wurde über einen Bradford-Testkit^R (Pierce) bestimmt. 200 µg mitochondriales Protein (energetisierte Mitochondrien) wurden zusammen mit 10 pmol des Chimären bei 37°C für 60 min. inkubiert (0.6 M Sorbitol, 10 mM Kaliumphosphat pH 7.4, 1 mM ATP, 2

Dr. Peter Seibel: Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment, Verfahren zu seiner Herstellung und Verfahren zur zielgerichteten Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen

45% des Chimären mit den Mitoplasten assoziiert ist, während die unspezifisch anhaftende DNA mit weniger als 3 % abgeschätzt werden konnte. Die isolierten Mitoplasten (Verlust der äußeren Membran und des Intermembranraums) wurden durch Lubrol^R (0.16 mg/mg Protein; ICN) lysiert und durch eine Ultrazentrifugation bei 144000 g in die

5 Kompartimente innere Mitochondrienmembran (Pellet) und Matrixraum (Überstand) getrennt. Die Zuordnung der Kompartimente erfolgte über die Messung der Aktivitäten der Cytochrom-c Oxidase (innere Mitochondrienmembran) und der Malat-Dehydrogenase (Matrixraum). Die Messung des Chimären erfolgte über die Detektierung der ³²P-Strahlung im Szintillationszähler und ergab zu 75 % eine Segregation mit der Matrix der

10 Mitochondrien, während 25 % des Chimären mit der inneren Membran der Mitochondrien assoziiert blieb (unvollständige Translokation).

Patentansprüche

- 1) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment umfaßend:
 - (a) Zell-, kompartiment- oder membranspezifisches Signalpeptid
 - (b) Kopplungsagenz
 - 5 (c) Nukleinsäure (Oligonukleotid)
- 2) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) aus mindestens zwei Basen besteht.
- 3) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) über eine

10 hybridisierungsfähige Sekundärstruktur verfügt.
- 4) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) über eine palindromische, bevorzugt partiell palindromische Sequenz verfügt.
- 5) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,

15 daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) eine ausgeprägte monomere Sekundärstruktur, bevorzugt einen 'hairpin-loop', ausbilden kann.
- 6) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) mit sich selbst hybridisieren und ein glattes 5'-3'-Ende ('blunt end'), bevorzugt aber ein überhängendes 3'- oder 5'-Ende ('sticky end') ausbilden kann.

20
- 7) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Nukleinsäure (Oligonukleotid) um eine Ribonukleinsäure, bevorzugt um eine Desoxyribonukleinsäure handelt.

- 8) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) chemisch modifizierte 'Phosphorthioat' Bindungen besitzt.
- 9) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäure (Oligonukleotid) eine reaktive Kopplungsgruppe trägt.
- 10) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Kopplungsgruppe eine Aminofunktion enthält, wenn das Kopplungsagenz eine aminoreaktive Gruppierung enthält.
- 10 11) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktive Kopplungsgruppe eine Thiofunktion enthält, wenn das Kopplungsagenz eine thiolreaktive Gruppierung enthält.
- 12) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppierung mindestens über einen C2-Spacer, bevorzugt aber einen C6-Spacer an die Nukleinsäure (Oligonukleotid) gebunden vorliegt.
- 13) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Kopplungsgruppierung am 3'-Hydroxy/Phosphat-Terminus oder am 5'-Hydroxy/Phosphat-Terminus der Nukleinsäure (Oligonukleotid), bevorzugt aber an der Base lokalisiert ist.
- 14) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 10-13, dadurch gekennzeichnet, daß an das 5'-Ende und/oder 3'-Ende definierte Nukleinsäuren, Antisense-Oligonukleotide, messenger RNAs oder transkribierbare und/oder replizierbare Gene angekoppelt werden.

- 15) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die anzukoppelnde Nukleinsäure chemisch modifizierte 'Phosphorthioat' Bindungen enthält.
- 5 16) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das anzukoppelnde Gen einen Promotor, bevorzugt einen mitochondrialen Promotor, enthält.
- 17) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-16, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid über eine reaktive Aminosäure am Carboxy-terminalen Ende, bevorzugt ein Lysin oder Cystein verfügt, wenn das
10 Kopplungsagenz eine amino- oder thiolreaktive Gruppierung enthält.
- 18) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid ein zell-, kompartment- oder membranspezifisches Erkennungssignal trägt.
- 15 19) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-18, dadurch gekennzeichnet, daß das Signalpeptid eine zell-, kompartment- oder membranspezifische Peptidasespaltstelle besitzt.
- 20) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß das Peptid aus dem kompartimentspezifisch spaltbaren Signalpeptid der menschlichen mitochondrialen Ornithintranscarbamylase,
20 verlängert um ein künstliches Cystein am C-Terminus, besteht.
- 21) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-20, dadurch gekennzeichnet, daß das Kopplungsagenz ein bifunktioneller, bevorzugt ein heterobifunktioneller Crosslinker ist.

- 22) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-21, dadurch gekennzeichnet, daß das Kopplungsagenz thiolreaktive und/oder aminoreaktive Gruppierungen enthält, wenn das Signalpeptid und die Nukleinsäure Thiol- und/oder Aminogruppen als Kopplungsstellen tragen.
- 5 23) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-22, dadurch gekennzeichnet, daß das Kopplungsagenz m-Maleimido-benzoyl-N-hydroxy-succinimidester, oder ein Derivat desselben, ist.
- 24) Chimäres Peptid-Nukleinsäure-Fragment nach einem der Ansprüche 1-23, dadurch gekennzeichnet, daß das Molekül unter Ausnutzung natürlicher
10 Transportmechanismen Membranen mit und ohne Membranpotential überwinden kann.
- 25) Verfahren zur Herstellung eines chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments nach einem der Ansprüche 1-24, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - 15 (a) Umsetzung einer Nukleinsäure (Oligonukleotid), enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, mit einem Kopplungsagenz.
 - (b) Umsetzung des Konstruktes aus (a) mit einem Peptid, enthaltend eine Signalsequenz.
 - (c) Wahlweise Verlängerung des chimären Peptid-Nukleinsäure (Oligonukleotid)-Fragments aus (b) um weitere DNA- oder
20 RNA-Fragmente ('Antisense'-Oligos, mRNAs, transkribierbare und/oder replizierbare Gene).
- 26) Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der DNA in Schritt (c) um ein PCR amplifiziertes DNA-Fragment, enthaltend den menschlichen mitochondrialen Promotor des leichten Stranges (P_L), sowie das Gen für die
25 mitochondriale transfer RNA Leucin (tRNA^{Leu}_(UUR)), handelt.

- 27) Verfahren zur Herstellung eines chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragments nach einem der Ansprüche 1-24, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- (a) Wahlweise Verlängerung der Nukleinsäure (Oligonukleotid), enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, um weitere DNA- oder RNA-Fragmente ('Antisense'-Oligos, mRNAs, transkribierbare und/oder replizierbare Gene).
 - (b) Umsetzung der Nukleinsäure (Oligonukleotid) mit funktioneller Kopplungsgruppe oder der verlängerten Nukleinsäure (Oligonukleotid) aus (a) mit einem Kopplungsagenz.
 - (c) Umsetzung des Konstruktes aus (b) mit einem Peptid, enthaltend eine Signalsequenz.
- 28) Verfahren nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der DNA in Schritt (a) um ein PCR amplifiziertes DNA-Fragment, enthaltend den menschlichen mitochondrialen Promotor des leichten Stranges (P_L), sowie das Gen für die mitochondriale transfer RNA Leucin ($tRNA^{Leu(UUR)}$), handelt.
- 29) Verfahren zur zielgerichteten Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen, nach einem der Ansprüche 1-24, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- (a) Umsetzung einer Nukleinsäure (Oligonukleotid), enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, mit einem Kopplungsagenz.
 - (b) Umsetzung des Konstruktes aus (a) mit einem Peptid, enthaltend eine Signalsequenz.
 - (c) Wahlweise Verlängerung des chimären Peptid-Nukleinsäure (Oligonukleotid)-Fragments aus (b) um weitere DNA- oder RNA-Fragmente ('Antisense'-Oligos, mRNAs, transkribierbare und/oder replizierbare Gene).
 - (d) Umsetzung des Konstruktes aus (b) oder (c) mit Zellen oder vorbehandelten Zellkompartimenten.

-
- 30) Verfahren zur zielgerichteten Nukleinsäureeinbringung in Zellorganellen und Zellen, nach einem der Ansprüche 1-24, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
- (a) Wahlweise Verlängerung der Nukleinsäure (Oligonukleotid), enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, um weitere DNA- oder RNA-Fragmente (Antisense-Oligos, mRNAs, transkribierbare und/oder replizierbare Gene).
 - (b) Umsetzung der verlängerten Nukleinsäure (Oligonukleotid) aus (a), enthaltend eine funktionelle Kopplungsgruppe, mit einem Kopplungsagenz.
 - (c) Umsetzung des Konstruktes aus (b) mit einem Peptid, enthaltend eine Signalsequenz.
 - (d) Umsetzung des Konstruktes aus (c) mit Zellen oder vorbehandelten Zellkompartimenten.
- 31) Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet daß es sich bei den vorbehandelten Zellkompartimenten um energetisierte Mitochondrien handelt.
- 32) Verwendung des chimären DNA-Fragmentes nach einem der Ansprüche 1-24 zur zielgerichteten Einbringung von Nukleinsäuren in Zellen oder Zellkompartimente.

Die vorliegende Erfindung wird insbesondere durch die Figuren erläutert, welche zeigen:

Fig. 1: Signalpeptid der Ornithintranscarbamylase der Ratte, sowie eine für die Einschleusung geeignete DNA-Sequenz. Oben: Signalpeptid der Ornithintranscarbamylase der Ratte (32 Aminosäuren), verlängert um zehn N-terminale Aminosäuren des maturierten Proteins und ein zusätzliches Cystein als Kopplungsstelle. Dargestellt ist die Peptidsequenz im internationalen Einbuchstabencode; Mitte: eine für die Einschleusung geeignete, partiell palindromische DNA-Sequenz aus 39 Nukleotiden mit einem aminomodifizierten T an Nukleotidposition 22; Unten: ausgeprägte Sekundärstruktur des Oligonukleotids mit überhängendem 5'-Ende und einem modifizierten Nukleotid im Scheitelpunkt des 'Loops'.

Fig. 2: Struktur des aminomodifizierten 2'-Deoxythymidin. R: Nukleinsäurereste.

Fig. 3: Schematische Darstellung des chimären Peptid-Nukleinsäure-Fragmentes, bestehend aus aminomodifiziertem Oligonukleotid (39 Nukleotide) mit ausgeprägtem 'Hairpin-Loop', Crosslinker und Signalpeptid. CL: Crosslinker.

Fig. 4: Elektrophoretische Auftrennung des Kopplungsproduktes aus aminomodifiziertem Oligonukleotid (39 Nukleotide), m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxy-succinimidester (MBS) und Signalpeptid der Ornithintranscarbamylase der Ratte (42 Aminosäuren, verlängert um ein Cystein am C-Terminus).

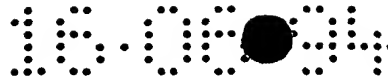


Fig. 5a: Ablaufdiagramm der Peptid-DNA-Fusion, Klonierung, Amplifizierung und Kopplung des einzuschleusenden transkribierbaren und prozessierbaren mitochondrialen tRNA-Gens (S. Anderson *et al.* (1981), "Sequence and organization of the human mitochondrial genome", Nature 290: 457-465). CL: Crosslinker (MBS); MCS: Multiple Klonierungsstelle von pBluescript^R (Stratagene); mtTF: Bindungsstelle des mitochondrialen Transkriptionsfaktors; RNA-Pol: Bindungsstelle der mitochondrialen RNA-Polymerase; tRNA Leucin: Gen der mitochondrialen transfer RNA für Leucin (UUR); *Sac II*, *Apa I*, *Eco RI*: Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen; Nummerierung der klonierten mitochondrialen Sequenzen erfolgte in Anlehnung an die veröffentlichte Sequenz des menschlichen mitochondrialen Genoms (S. Anderson *et al.* (1981), "Sequence and organization of the human mitochondrial genome", Nature 290: 457-465).

Fig. 5b: Sequenz des klonierten tRNA^{Leu(UUR)}-Gens.

Fig. 6a/b: Darstellung der ³²P-Strahlung der DNA, sowie der Enzymaktivitäten für Adenylat-Kinase, Cytochrom c-Oxidase und Malat-Dehydrogenase (y-Achsen) in 11 Fraktionen (x-Achsen) einer Mitochondrien-Sucrosegradientendichtezentrifugation. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Strahlung/Enzymaktivität, ausgedrückt als prozentualer Anteil der Gesamtstrahlung/Enzymaktivität, die auf den Gradienten aufgetragen wurde. ADK: Adenylat-Kinase; COX: Cytochrom c-Oxidase; MDH: Malat-Dehydrogenase.

Fig. 7a/b: Darstellung der ³²P-Strahlung der DNA, sowie der Enzymaktivitäten für Adenylat-Kinase, Cytochrom c-Oxidase und Malat-Dehydrogenase (y-Achsen) in 11 Fraktionen (x-Achsen) einer Mitoplasten-Sucrosegradientendichtezentrifugation. Dargestellt ist der Anteil der jeweiligen Strahlung/Enzymaktivität, ausgedrückt als prozentualer Anteil der Gesamtstrahlung/Enzymaktivität, die auf den Gradienten aufgetragen wurde. ADK: Adenylat-Kinase; COX: Cytochrom c-Oxidase; MDH: Malat-Dehydrogenase.

Figur 1

M-L-S-N-L-R-I-L-L-N-K-A-A-L-R-K-A-H-T-S-M-V-R-N-F-R-Y-G-K-P-V-Q-S-Q-V-Q-L-K-P-R-D-L-C

Amino-Terminus ←

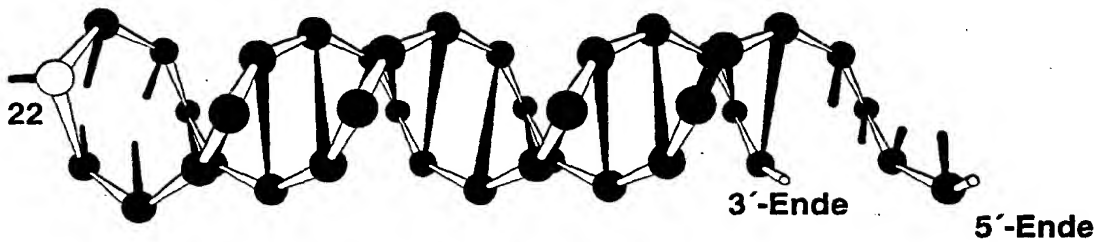
→ Carboxy-Terminus

22

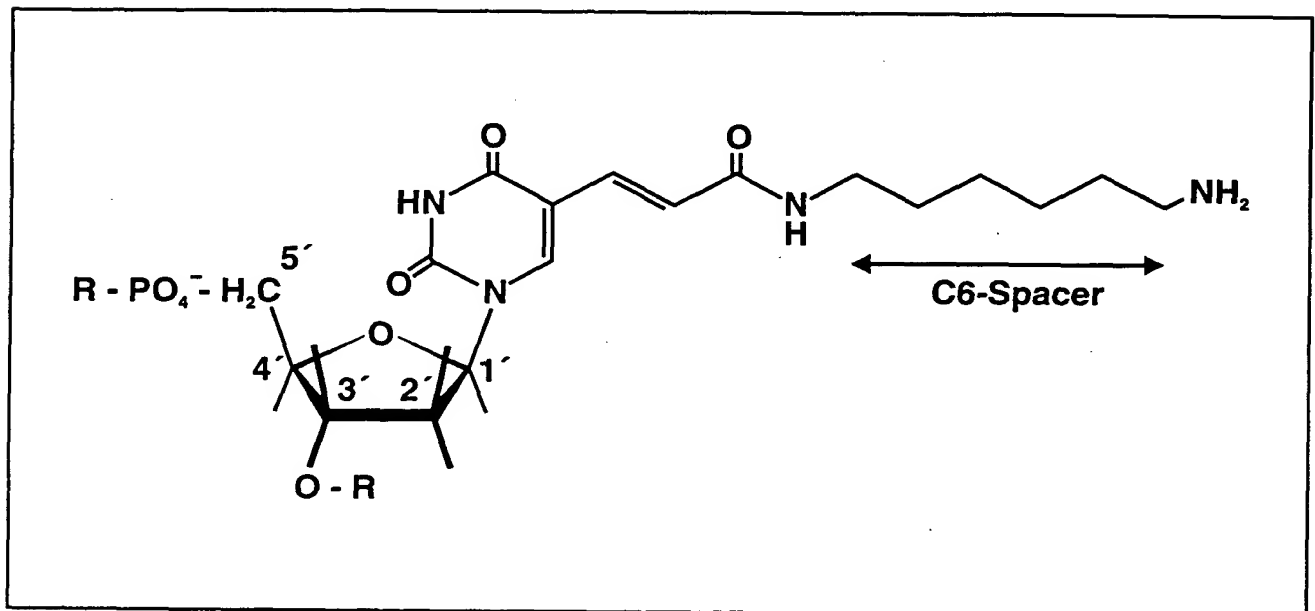
CCCCGGGTACCTTGCGAGCCCTGGGCTCGCAAGGTACCC

5'-Ende ←

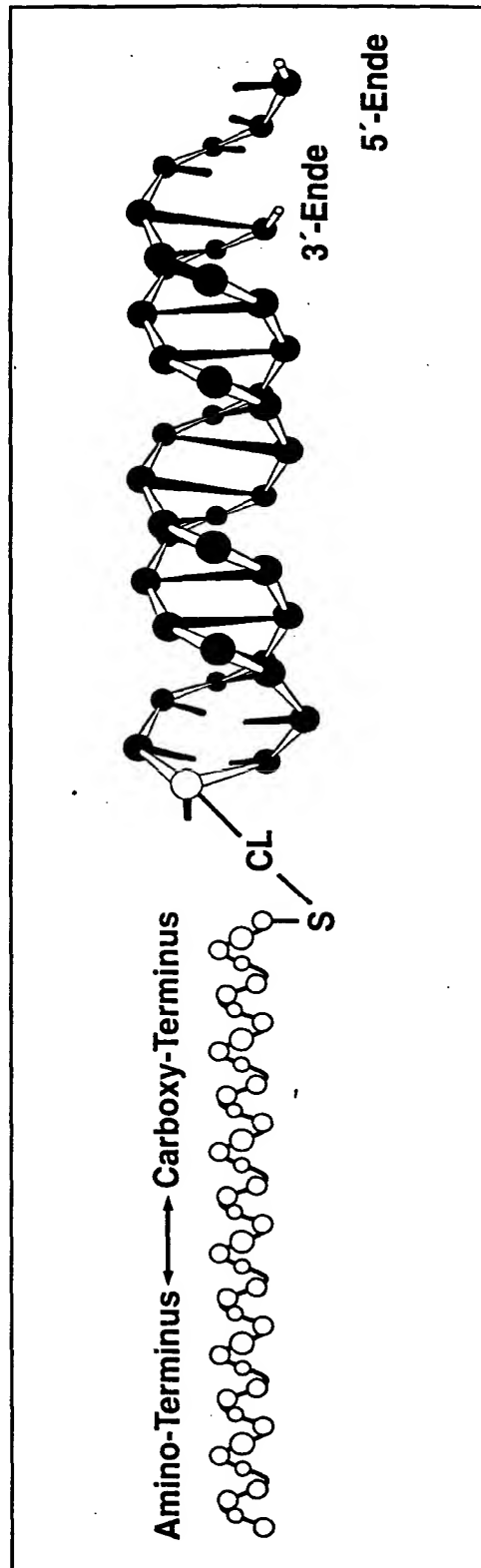
→ 3'-Ende

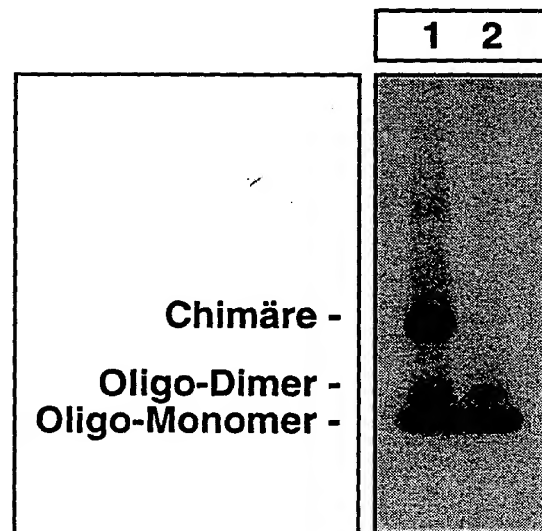


Figur 2

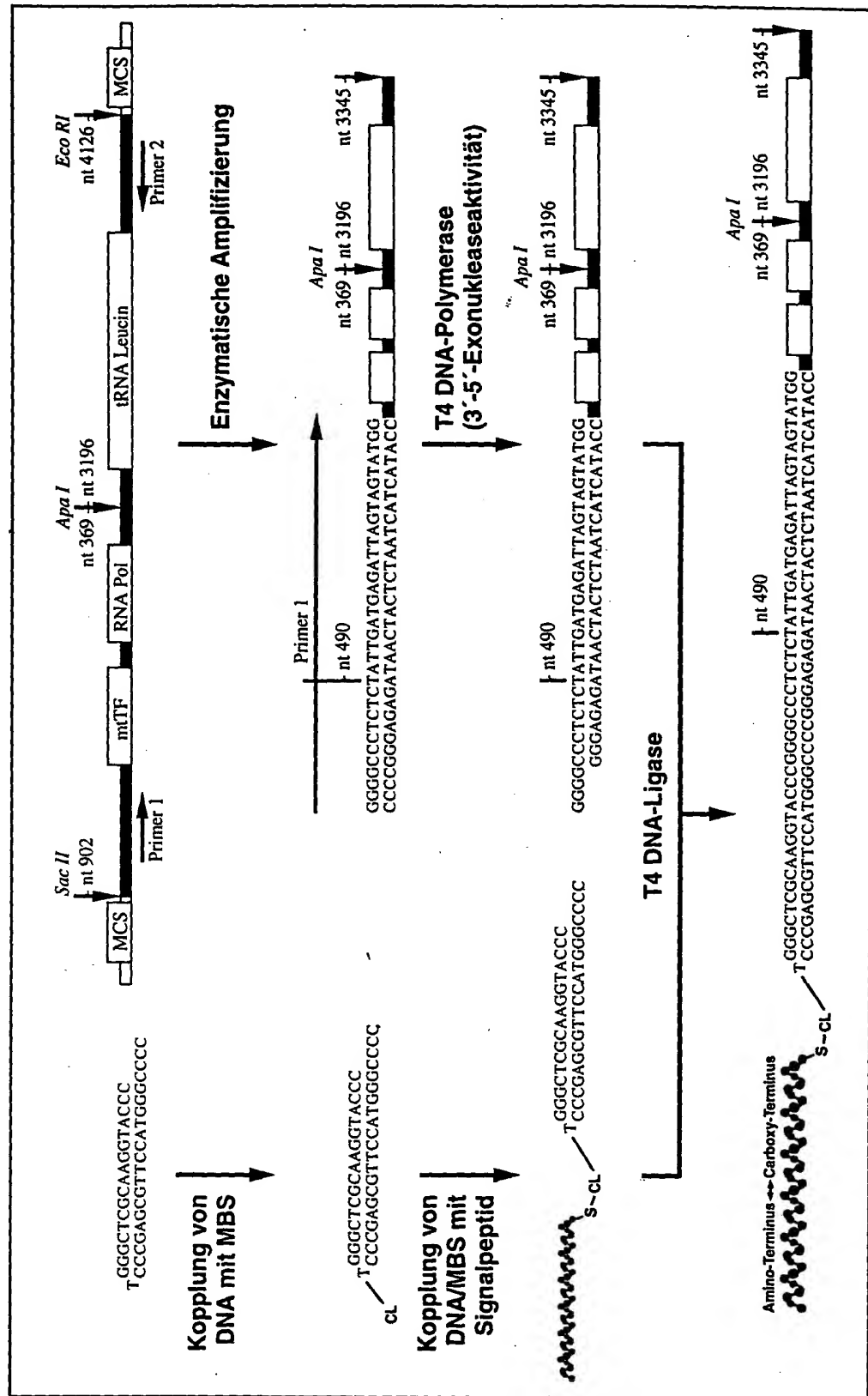


Figur 3



Figur 4

Figur 5a

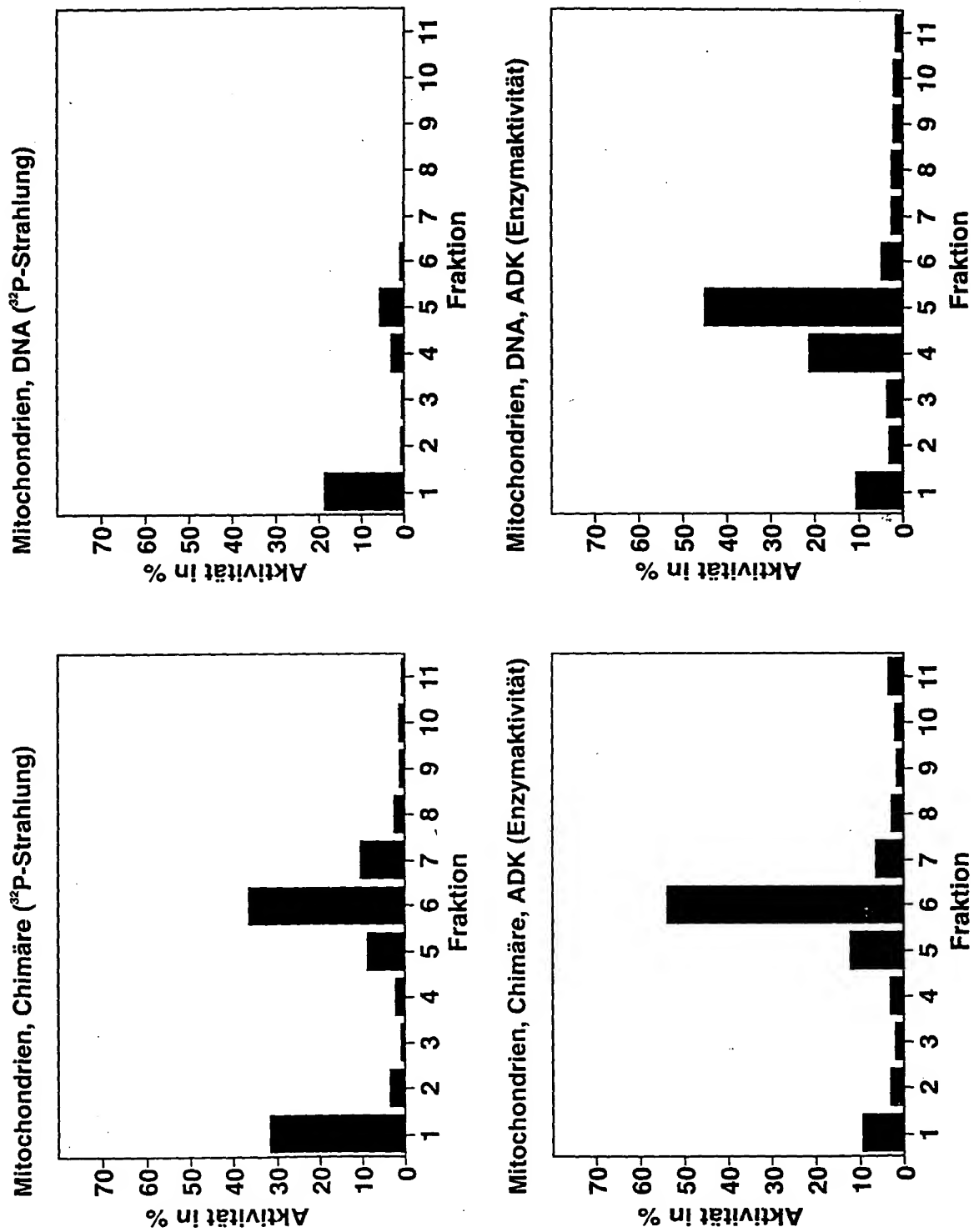


Figur 5b

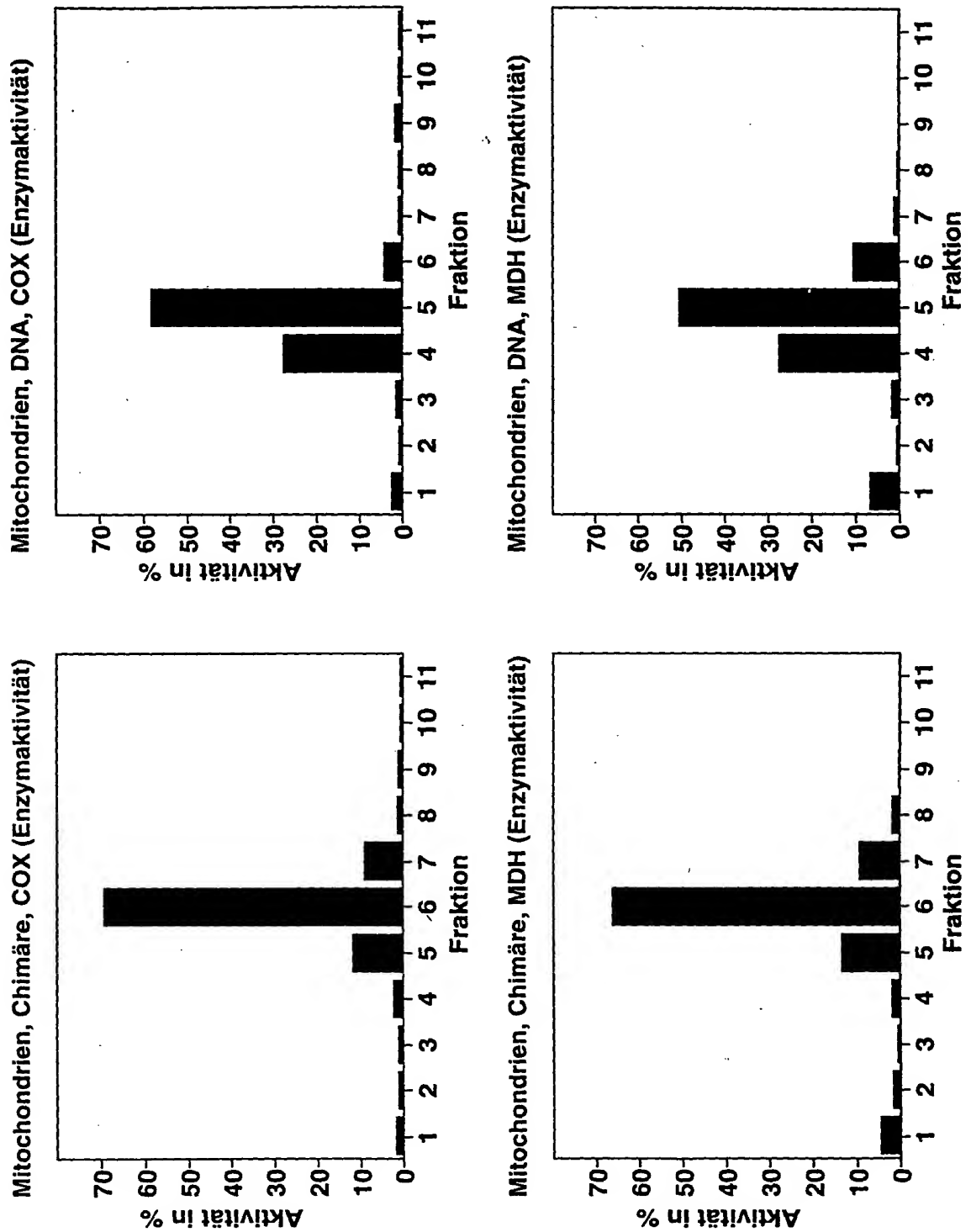
	10	20	30	40	50	60
	CCGCGGTGGC	TGGCACGAAA	TTGACCAACC	CTGGGGTTAG	TATAGCTTAG	TTAAACTTTC
	GGCGCCACCG	ACCGTGCTTT	AACTGGTTGG	GACCCCAATC	ATATCGAATC	AATTTGAAAG
5	70	80	90	100	110	120
	GTTTATTGCT	AAAGGTTAAT	CACTGCTGTT	TCCCGTGGGG	GTGTGGCTAG	GCTAAGCGTT
	CAAATAACGA	TTTCCAATTA	GTGACGACAA	AGGGCACCCC	CACACCGATC	CGATTTCGCA
	130	140	150	160	170	180
	TTGAGCTGCA	TTGCTGCGTG	CTTGATGCTT	GTTTCCTTTT	ATCGTGGTGA	TTTAGAGGGT
10	AACTCGACGT	AACGACGCAC	GAACTACGAA	CAAGGAAAAC	TAGCACCCT	AAATCTCCCA
	190	200	210	220	230	240
	GAACCTACTG	GAACGGGGAT	GCTTGCGTGT	GTAATCTTAC	TAAGAGCTAA	TAGAAAGGCT
	CTTGAGTGAC	CTTGCCCCCTA	CGAACGTACA	CATTAGAATG	ATTCTCGATT	ATCTTTCCGA
	250	260	270	280	290	300
15	AGGACCAAAC	CTATTTGTTT	ATGGGGTGAT	GTGAGCCCGT	CTAAACATTT	TCAGTGTATT
	TCCTGGTTTG	GATAAACAAA	TACCCCACTA	CACTCGGGCA	GATTTGTAAA	AGTCACATAA
	310	320	330	340	350	360
	GCTTTGAGGA	GGTAAGCTAC	ATAAACTGTG	GGGGGTGTCT	TTGGGGTTTG	GTTGGTTCGG
	CGAAACTCCT	CCATTTCGATG	TATTTGACAC	CCCCCACAGA	AACCCCAAAC	CAACCAAGCC
20	370	380	390	400	410	420
	GGTATGGGGT	TAGCAGCGGT	GTGTGTGTGC	TGGGTAGGAT	GGGCGGGGGT	TGTATTGATG
	CCATACCCCA	ATCGTCGCCA	CACACACACG	ACCCATCCTA	CCCGCCCCCA	ACATAACTAC
	430	440	450	460	470	480
	AGATTAGTAG	TATGGGAGTG	GGAGGGGAAA	ATAATGTGTT	AGTTGGGGGG	TGACTGTAA
25	TCTAATCATC	ATACCCTCAC	CCTCCCCTTT	TATTACACAA	TCAACCCCCC	ACTGACAATT
	490	500	510	520	530	540
	AAGTGCATAC	CGCCAAAAGA	TAAAATTTGA	AATCTGGTTA	GGCTGGTGTG	AGGGCCCTTT
	TTCACGTATG	GCGGTTTTCT	ATTTTAAACT	TTAGACCAAT	CCGACCACAA	TCCCGGGAAA
	550	560	570	580	590	600
30	GTCCACACAC	CACCCAAGAA	CAGGGTTTGT	TAAGATGGCA	GAGCCCGGTA	ATCGCATAAA
	CAGGGTGTGG	GTGGGTCTT	GTCCCAAACA	ATTCTACCGT	CTCGGGCCAT	TAGCGTATTT
	610	620	630	640	650	660
	ACTTAAACT	TTACAGTCAG	AGGTTCAATT	CCTCTTCTTA	ACAACATACC	CATGGCCAAC
	TGAATTTTGA	AATGTCAGTC	TCCAAGTTAA	GGAGAAGAAT	TGTTGTATGG	GTACCGGTTG
35	670	680	690	700	710	720
	CTCCTACTCC	TCATTGTACC	CATTCTAATC	GCAATGGCAT	TCCTAATGCT	TACCGAACGA
	GAGGATGAGG	AGTAACATGG	GTAAGATTAG	CGTTACCGTA	AGGATTACGA	ATGGCTTGCT
	730	740	750	760	770	780
	AAAATTCTAG	GCTATATACA	ACTACGCAAA	GGCCCCAACG	TGGTAGGCCC	CTACGGGCTA
40	TTTTAAGATC	CGATATATGT	TGATGCGTTT	CCGGGGTTGC	ACCATCCGGG	GATGCCCCGAT

	790	800	810	820	830	840
	CTACAACCCCT	TCGCTGACGC	CATAAAACTC	TTCACCAAAG	AGCCCCTAAA	ACCCGCCACA
	GATGTTGGGA	AGCGACTGCG	GTATTTTGAG	AAGTG GTTTC	TCGGGGATT	TGGGCGGTGT
	850	860	870	880	890	900
5	TCTACCATCA	CCCTCTACAT	CACCGCCCCG	ACCTTAGCTC	TCACCATCGC	TCTTCTACTA
	AGATGGTAGT	GGGAGATGTA	GTGGCGGGGC	TGGAATCGAG	AGTGGTAGCG	AGAAGATGAT
	910	920	930	940	950	960
	TGAACCCCCC	TCCCCATACC	CAACCCCTG	GTCAACCTCA	ACCTAGGCCT	CCTATTTATT
	ACTTGGGGGG	AGGGGTATGG	GTTGGGGGAC	CAGTTGGAGT	TGGATCCGGA	GGATAAATAA
10	970	980	990	1000	1010	1020
	CTAGCCACCT	CTAGCCTAGC	CGTTTACTCA	ATCCTCTGAT	CAGGGTGAGC	ATCAAACCTCA
	GATCGGTGGA	GATCGGATCG	GCAAATGAGT	TAGGAGACTA	GTCCCACTCG	TAGTTTGAGT
	1030	1040	1050	1060	1070	1080
15	AACTACGCCC	TGATCGGCGC	ACTGCGAGCA	GTAGCCCAAA	CAATCTCATA	TGAAGTCACC
	TTGATGCGGG	ACTAGCCGCG	TGACGCTCGT	CATCGGGTTT	GTTAGAGTAT	ACTTCAGTGG
	1090	1100	1110	1120	1130	1140
	CTAGCCATCA	TTCTACTATC	AACATTACTA	ATAAGTGGCT	CCTTTAACCT	CTCCACCCTT
	GATCGGTAGT	AAGATGATAG	TTGTAATGAT	TATTCACCGA	GGAAATTGGA	GAGGTGGGAA
	1150	1160	1170	1180	1190	1200
20	ATCACAACAC	AAGAACACCT	CTGATTACTC	CTGCCATCAT	GACCCCTGGC	CATAATATGA
	TAGTGTTGTG	TTCTTGTTGGA	GACTAATGAG	GACGGTAGTA	CTGGGAACCG	GTATTATACT
	1210	1220	1230	1240	1250	1260
	TTTATCTCCA	CACTAGCAGA	GACCAACCGA	ACCCCTTCG	ACCTTGCCGA	AGGGGAGTCC
	AAATAGAGGT	GTGATCGTCT	CTGGTTGGCT	TGGGGGAAGC	TGGAACGGCT	TCCCCTCAGG
25	1270	1280	1290	1300	1310	1320
	GAACTAGTCT	CAGGCTTCAA	CATCGAATAC	GCCGCAGGCC	CCTTCGCCCT	ATTCTTCATA
	CTTGATCAGA	GTCCGAAGTT	GTAGCTTATG	CGGCGTCCGG	GGAAGCGGGA	TAAGAAGTAT
	1330	1340	1350	1360	1370	1380
30	GCCGAATACA	CAAACATTAT	TATAATAAAC	ACCCTCACCA	CTACAATCTT	CCTAGGAACA
	CGGCTTATGT	GTTTGTAATA	ATATTATTTG	TGGGAGTGGT	GATGTTAGAA	GGATCCTTGT
	1390	1400	1410	1420	1430	1440
	ACATATGACG	CACTCTCCCC	TGAACCTCTAC	ACAACATATT	TTGTCACCAA	GACCCTACTT
	TGTATACTGC	GTGAGAGGGG	ACTTGAGATG	TGTTGTATAA	AACAGTGGTT	CTGGGATGAA
	1450	1460				
35	CTAACCTCCC	TGTTCTTATG	AATTC			
	GATTGGAGGG	ACAAGAATAC	TTAAG			

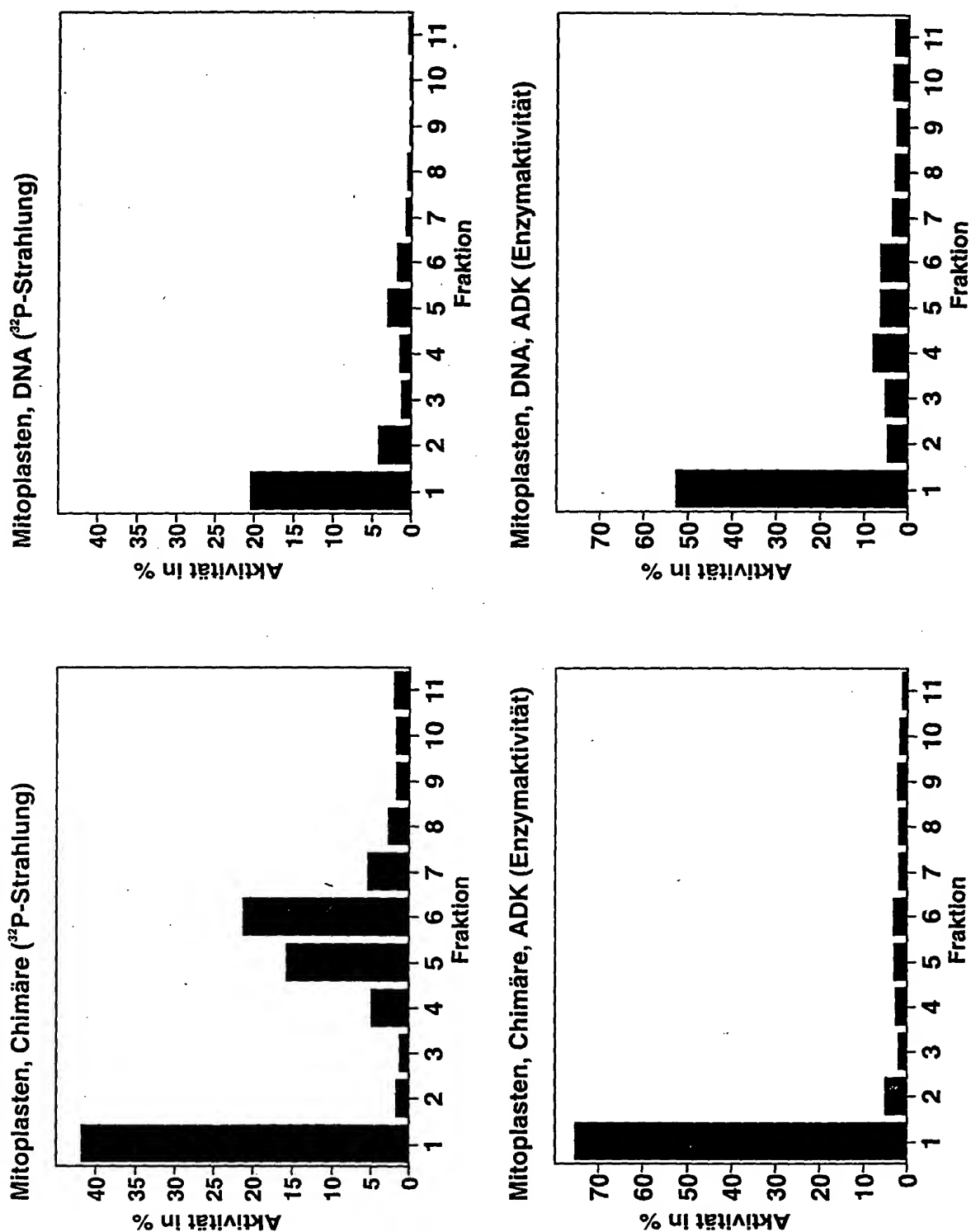
Figur 6a



Figur 6b



Figur 7a



Figur 7b

